

由图 4 可以看出,膜通量 LMH 曲线平缓,前期略微下降,后期可是缓慢上升,这是由于重组蛋白发酵液杂蛋白较多,粘度较大,前期微滤透析,膜通量 LMH 会略微下降,随着微滤透析进行,部分杂质不断透过,发酵液粘度降低,发酵液变得较为干净,透过速度变快,所以膜通量 LMH 越来越大。

**2.5 蛋白透过情况** 在 2.4 微滤透析过程中,初始取样为 0,在洗滤过程中,洗滤透析体积为 1 倍、2 倍、3 倍、4 倍时取重组蛋白料液样,分别记为 0、1、2、3、4,以及取对应透过样,分别记为 0 侧、1 侧、2 侧、3 侧、4 侧。将这些样品按照《中国药典》2005 年版二部 SDS-PAGE 检测蛋白方法检测,10 $\mu$ L 上样,同时上目的蛋白标样 7 $\mu$ g,电泳图谱如下:

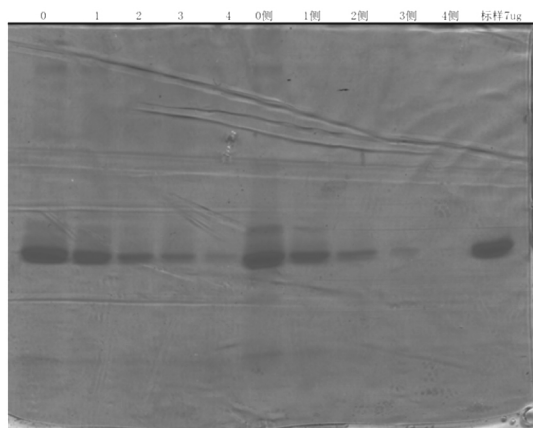


图 5 蛋白透过电泳图谱

由图 5 可以看出,重组蛋白发酵液在洗滤进行 3 倍体积时,目的蛋白透过约 90%,洗滤 4 倍体积时,目的蛋白基本透

过,微滤透过效果良好。

### 3 结论

通过以上实验图谱和数据,确定了最佳实验数据:TMP 为 0.35bar 和切向流速度 0.8m $\cdot$ s<sup>-1</sup>。采用此方法分离重组蛋白发酵液目的蛋白,效果良好,可以有效的去除杂质,有选择的收集目的蛋白,而微滤自身的一些特有的优势,微滤在发酵后期澄清分离有着广阔的应用前景。

#### 参考文献

- (1) 中空纤维膜操作手册(S). GE Healthcare 2009 2-27.
- (2) Anil K. Pabby, Syed S. H. Rizvi, Ana Maria Sastre Requena. Handbook of Membrane Separations: Chemical, Pharmaceutical, Food, and Biotechnological Applications (J). CRC Press 2008 553-578.
- (3) 宋伟杰, 陈国强, 苏仪, 等. 微滤技术在发酵工业中的应用 (J). 生物产业技术 2010 (4): 65-71.
- (4) 凤权, 汤斌. 粘杆菌素发酵液微滤膜分离处理过程研究 (J). 生物学杂志 2010 27(1): 43-45.
- (5) 郭方宁. 膜分离技术在药物分离中的应用 (J). 天津药学 2010, 22(2): 65-69.
- (6) 刘振民. 采用微滤膜浓缩乳酸杆菌发酵液的工艺条件研究 (J). 食品与发酵工业 2004 30(10): 73-76.
- (7) 许赵辉, 王焕章, 李必文, 等. 陶瓷膜过滤谷氨酸发酵液过程中的膜污染与对策 (J). 食品工业科技 2002 (2): 32-34.
- (8) 何明, 尹国强, 王品. 微滤膜分离技术的应用进展 (J). 广州化工, 2009 37(6): 35-37.
- (9) 曹占平, 张景丽, 张宏伟. 微滤膜过滤阻力机理及模型研究 (J). 膜科学与技术 2010 30(1): 18-23.
- (10) 甘胜, 周旺. 混凝-微滤处理重金属废水的研究 (J). 西安文理学院学报: 自然科学版 2010 13(3): 87-90.

## • 临床药学 •

### 高效液相色谱法测定万古霉素血药浓度的分析与研究

宋祖栏(厦门大学附属第一医院药学部 厦门 361000)

**摘要:** 目的 探讨万古霉素采用高效液相色谱法测定血药浓度效果。方法 本次实验应用外标法定量,经 5% 高氯酸处理万古霉素血浆样品,应用高效液相色谱法对血药浓度测定。结果 血浆中万古霉素在 1.56~100.00mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 浓度范围时,具良好的线性关系,为 0.33mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 检测限,1.56mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 定量限。为 97.25% 平均回收率, RSD 为 1.16%。高、中、低浓度 RSD 日内均值为 1.31%, RSD 日间均值为 1.66%。结论 万古霉素采用高效液相色谱法对血药浓度测定,具取样量少、准确、快速、灵敏等优点,有较高应用价值。

**关键词:** 高效液相色谱法; 万古霉素; 血药浓度

中图分类号: R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1006-3765(2017) 07-1006-0050-03

### Analysis and Study on the Determination of Serum Concentration of Vancomycin by HPLC

**作者简介:** 宋祖栏,女(1987.11- )。毕业于福建中医药大学。职称:主管药师。从事医院药学工作。

SONG Zu-lan( The first affiliated hospital of Xiamen University ,Xiamen 361000 ,China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To investigate the effect of high performance liquid chromatography on the determination of serum drug concentration by high performance liquid chromatography. **METHODS** The external standard method was used to determine the plasma concentrations of vancomycin in plasma samples. The plasma concentrations were determined by high performance liquid chromatography with 5% hydrochloric acid. **RESULTS** The plasma concentration of vancomycin had a good linear relationship in the  $1.56 \sim 100.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  concentration range ,with  $0.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  detection limit , $1.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  quantitative limit. The average recovery rate was 97.25% ,RSD was 1.16% ,daily average of High ,medium and low concentrations RSD were 1.31% ,average inter-day RSD was 1.66%. **CONCLUSION** The high performance liquid chromatography method for the determination of plasma concentration ,with the advantages of less sampling accurate rapid and sensitive has higher application value.

**KEY WORDS:** High performance liquid chromatography; Vancomycin; Plasma concentration

万古霉素可抑制细菌细胞壁中期肽聚糖的合成 ,且对细胞质膜改变有一定的促进作用 ,使 RNA 的合成受抑 ,进而在一定程度上损伤原生质体 ,具较强杀灭革兰阳性菌作用 ,属糖肽类抗菌药物 ,是现阶段首选对耐甲氧西林金葡菌治疗药物。有研究指出 ,万古霉素有较高的谷浓度、疗程长、为主要引起肾毒性的危险因素<sup>(1)</sup>。国内外指南目前均推荐应用万古霉素 ,强调行药物监测可实现个体化给药 ,维持血药浓度在有效、安全范围 ,并降低耐药菌产生机率<sup>(2)</sup>。本次研究应用高效液相色谱法对万古霉素血药浓度测定 ,具操作简单、血药取样量少、快速等优点 ,现将具体监测内容报告如下。

## 1 材料

**1.1 仪器** KQ-250DE 数控超声波清洗器( 昆山市超声仪器有限公司); LC20A 高效液相色谱仪( 日本岛津公司); 津腾 GM-0.5B 隔膜真空泵( 天津市津腾实验设备有限公司); FE-20K 酸度计( 德国 METTLER TOLEDO 公司); Mini14K 微型高速离心机( 杭州奥盛仪器有限公司); 移液器( 德国 METTLER TOLEDO 公司); 涡旋混匀器( Scientific Industries)。

**1.2 试剂** 乙腈( 天津市化学试剂一厂 ,生产批号: 120917) ,万古霉素标准品( 上海士锋科技有限公司 ,生产批号: K0059) ,磷酸二氢钾( 天津市化学试剂一厂 ,生产批号: 130507) ,高氯酸( 天津市化学试剂一厂 ,生产批号: 121028) 、磷酸( 天津市化学试剂一厂 ,生产批号: 120315) ,乙腈为色谱纯 ,高氯酸、磷酸、磷酸二氢钾均为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 实验色谱条件** 保护柱: 设置为 Inertsil ODS-SP  $C_{18}$  (  $10 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$  , $5 \mu \text{m}$ ); 色谱柱: 设置为 Inertsil ODS-SP  $C_{18}$  (  $150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$  , $5 \mu \text{m}$ ); 流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 流动相: 设置为乙腈- $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( pH 3.2) 的磷酸二氢钾缓冲液 ,即 11.5:88.5; 检测波长  $230 \text{ nm}$  ,进样量  $20 \mu \text{L}$  ,柱温  $30^\circ \text{C}$ 。

**2.2 配制溶液** ①制备标准品溶液: 对万古霉素标准品精密称取 ,称取量为  $11 \text{ mg}$  ,在  $10 \text{ mL}$  量瓶中放置 ,实成纯水溶解定容后 ,至刻度处 ,配置  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  标准品溶液 ,保存在  $-20^\circ \text{C}$  冰箱中备用。②处理血样: 取  $100 \mu \text{L}$  血浆样品在  $1.5 \text{ mL}$  离心管中放置 ,加入  $100 \mu \text{L}$  5% 高氯酸溶液 ,涡旋  $3 \text{ min}$  ,离心

$5 \text{ min}$  (  $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  ) 检测上清液 ,进样量  $20 \mu \text{L}$ 。自应用万古霉素的患者取血液样品。

**2.3 专属性考查** 本次研究所用万古霉素于实验中 ,上述色谱条件下 ,安排  $8.7 \text{ min}$  保留 ,色谱峰峰形观察呈尖锐状时 ,分离较理想 ,理论塔板数经测定  $> 3000$  ,实用分离度  $> 1.5$  ,实验拖尾因子  $< 1.2$  ,于血浆中分布的内源性杂质未干扰测定过程。

**2.4 绘制标准曲线** 取适量万古霉素标准溶液 ,加入空白血样 ,配制浓度为  $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $6.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $3.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的实验用血浆样品。参考“血样处理”项下的具体方法进行检测。以纵坐标为万古霉素峰面积  $Y$  ,横坐标为血浆万古霉素浓度(  $X$  ) ,行回归运算 ,获得回归方程 ,具体为:  $Y = 20411X + 18094$  , (  $r = 1$  )。结果显示 ,血浆中万古霉素在  $1.56 \sim 100.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度范围时 ,具良好的线性关系 ,为  $0.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  检测限 , $1.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  定量限。

**2.5 回收率试验** 对万古霉素血浆样品配置  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  各 3 份 ,测定根据实验中“血样处理”项下的具体方法开展。以标准曲线回归方程正确计算样品浓度 ,依据实测浓度与理论浓度具体比值对回收率计算 ,为 97.25% 平均回收率 ,RSD 经测定为 1.16%。

**2.6 精密度试验** 对万古霉素血浆样品配置  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  各 5 份 ,依据“血样处理”项下具体操作步骤实施。1 日内对不同万古霉素浓度样品测取 ,完成日内精密度计算 ,依据上述浓度血样每日各制备 5 份 ,连续测 3d ,获取日间精密度。高、中、低浓度 RSD 日内均值为 1.31% ,经统计 RSD 日间均值为 1.66%。

**2.7 检测稳定性** 对万古霉素  $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  即低浓度、 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  即中浓度、 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  即高浓度血浆样品在  $-20^\circ \text{C}$  冰箱中冷冻 7d、室温避光放置 12h、 $-20^\circ \text{C}$  冰箱冻融循环 3 次后相关稳定性考查。经不同条件保存后 ,测定浓度 ,中高浓度偏差  $< 15\%$  ,低浓度偏差  $< 20\%$  ,RSD 在  $0.58 \sim 4.76\%$  之间。

## 3 讨论

临床测定万古霉素血药浓度的方法有高效液相色谱法、

荧光偏振免疫法、微生物法等。但荧光偏振免疫法专属性差,结果偏高,且试剂盒价格昂贵,使其临床应用受限;微生物法用时过长<sup>(3,4)</sup>。而高效液相色谱法有较高的准确度,具相对强的专属性,在万古霉素血药浓度中更为适用<sup>(5)</sup>。本次实验应用此种方法,重视流动相、蛋白沉淀剂、外标法的选择,结合结果,血浆中万古霉素在  $1.56 \sim 100.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度范围时,具良好的线性关系,为  $0.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  检测限,  $1.56 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  定量限。为 97.25% 平均回收率, RSD 为 1.16%。高、中、低浓度 RSD 日内均值为 1.31%, RSD 日间均值为 1.66%。提示采用高效液相色谱法对万古霉素血药浓度测定,结果准确、方法快速、操作简单、取样量少、反馈及时,在药动学研究和血药浓度监测中较适合应用,为临床合理、安全用药提供了保障。

#### 参考文献

- (1) 刘胜男,王佳庆,梅升辉,等. HPLC 法测定人血浆中万古霉素浓度及其药动学研究(J). 实用药物与临床, 2013, 16(5): 426-428.
- (2) Elyasi S, Khalili H, Dashti-Khavidaki S, et al. Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review (J). Eur J Clin Pharmacol, 2012, 68(9): 1243-1255.
- (3) 王秀锦,蔡郁,魏国义,等. 64 例老年患者万古霉素血药浓度监测结果分析(J). 中国临床药理学杂志, 2012, 28(11): 803-805.
- (4) 罗奕,刘文,邓楠,等. 万古霉素血药浓度监测方法的建立及稳定性考察(J). 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(20): 133-135.
- (5) 蔡琰,徐凯. 高效液相色谱法测定人血清中万古霉素浓度(J). 海峡药学, 2012, 24(9): 249-251.

## RP-HPLC 法测定人血浆中卡马西平浓度

王丽霞<sup>1</sup>, 陈清霞<sup>2</sup>, 杨红梅<sup>3</sup>, 梁小丽<sup>3</sup>, 刘伟忠<sup>1</sup> (1. 广州医科大学附属脑科医院(广州市惠爱医院) 药学部 广州 510370; 2. 中山大学附属第二医院药学部 广州 510120; 3. 广州市妇女儿童医疗中心药学部 广州 510120)

**摘要:** 目的 建立反相高效液相色谱法测定人血浆中卡马西平浓度的方法。方法 以 Agilent TC-C<sub>18</sub> 反相柱(150mm×4.6mm 5μm) 为色谱柱, 流动相为 0.03mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵-乙腈-甲醇(20:15:65 V/V/V); 流速: 0.8mL·min<sup>-1</sup>; 检测柱温: 35℃; 检测波长: 285nm。灵敏度为 0.01AUFS。以乙酸乙酯和二氯甲烷(80:20 V/V) 为提取剂。结果 卡马西平的低、中、高(2.0, 8.0, 48.0 μg·mL<sup>-1</sup>) 3 种浓度平均相对回收率分别为 101.1%, 100.6%, 99.89%。提取回收率分别为 81.91%, 85.02%, 88.53%; 日内、日间相对标准偏差(RSD) 均低于 10% (n=5); 分析方法的检测限 0.5 μg·mL<sup>-1</sup>; 线性范围为 1.0~64.0 μg·mL<sup>-1</sup>。线性方程: Y = 12.512X + 1.46, 相关系数 r = 0.9991 (n=8)。结论 该方法简单、快速、灵敏、准确, 可用于卡马西平临床血药浓度监测和药动学研究。

**关键词:** 卡马西平; 血药浓度; 高效液相色谱法

中图分类号: R969.1 文献标识码: B 文章编号: 1006-3765(2017) 07-03244-0052-04

## Determination of the Concentration of Carbamazepine in Human Plasma by RP-HPLC with UV Detection

WANG Li-xia<sup>1</sup>, CHEN Qing-xia<sup>2</sup>, YANG Hong-mei<sup>3</sup>, LIANG Xiao-li<sup>3</sup>, LIU Wei-zhong<sup>1</sup> (1. Department of Pharmacy, The Affiliated Brain Hospital of Guangzhou Medical University (Guangzhou Huiai Hospital) Guangzhou 510370, China; 2. Department of pharmacy, The Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China; 3. Department of pharmacy, Guangzhou women and children's medical center, Guangzhou 510120, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method for determining the concentration of carbamazepine in human plasma by RP-HPLC. **METHODS** The drug from plasma was analyzed in a reverse phase HPLC system Agilent TC-C<sub>18</sub> column(150 mm×4.6mm 5μm); mobile phase consisted of 0.03mol·L<sup>-1</sup> ammonium-acetonitrile-methanol(20:15:65v/v/v); the flow rate was 0.8mL·min<sup>-1</sup>; the detection temperature was at 35℃, the detection wavelength was at 285nm. The sensitivity was 0.01 AUFS. Ethyl acetate and dichloromethane was used as extracting solvent. **RESULTS** The average recoveries of carbamazepine in low, middle and high concentrations (2.0, 8.0,

**作者简介:** 王丽霞,女(1975.10-)。学历:学士。职称:主管药师。从事医院药学和临床药学工作。联系电话:020-81268188, E-mail: wanglixia13888@163.com

**通讯作者:** 刘伟忠。职称:主任药师。从事治疗药物监测。联系电话:020-81268052, E-mail: liuweizhong999@163.com